

# LC/MS/MSによるコルヒチンの分析

武原弘和 坂口美鈴 汐田佳奈美 稲田裕司 小山信 近藤芳樹 藤井幸三

## 1 はじめに

コルヒチンはイヌサフラン（コルチカム）やグロリオサ等の植物に含まれるアルカロイドで医薬品として使用されることもあるが、強い毒性を持ち誤食すれば死に至ることもある化合物である。

今回、ヤマイモと誤食の危険性のあるグロリオサをターゲットとして LC/MS/MS によるコルヒチンの分析法の検討を行った。

## 2 検査方法

### (1) 試料

出汁入り大和芋とろろ（グロリオサ誤食を想定）、グロリオサ球根

### (2) 試薬及び器具

コルヒチン（和光純薬製）、デメコルシン（和光純薬製）、メタノール（LC/MS 用）、アセトニトリル（LC/MS 用）、1mol/L 酢酸アンモニウム（HPLC 用）、固相抽出用 C18 カラム（GL サイエンス社製 InertSep）

### (3) 分析装置及び分析条件

液体クロマトグラフ質量分析装置（LC/MS/MS）：LCMS-8050（島津製作所）

#### LC 条件

カラム：Waters 製 CORTECS T3 150×2.1mm 2.7 $\mu$ m、カラム温度 40℃、流速 0.2mL/min、注入量 5 $\mu$ L、移動相：A;1mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、B;メタノール、グラジエント：B 濃度 30%→2分→60%→1分→100%(5分)→0.1分→30%(5分)

#### MS 条件

検出器：ESI(+)、ネブライザーガス：3L/min、ヒーティングガス：10L/min、ドラインガス：10L/min、インターフェイス温度 275℃、DL 温度 250℃、ヒートブロック温度 250℃、インターフェイス電圧 4.0kV

表1 MRM 条件

	コルヒチン	デメコルシン
定量イオン	400.25/358.15	372.10/310.00
確認イオン 1	400.25/310.10	372.10/340.25
確認イオン 2	400.25/326.10	372.10/341.10
確認イオン 3	400.25/395.05	
確認イオン 4	400.25/341.10	

#### (4) 試験溶液の調製

##### a)抽出

均質化した試料 5.00g を計り取り、アセトニトリル 20mL を加え、ホモジナイズした後、遠心分離し上澄を 0.45  $\mu$  m PTFE フィルターでろ過する。沈殿にアセトニトリル 10mL を加え、懸濁後 5 分間超音波抽出、遠心分離し上澄を 0.45  $\mu$  m PTFE フィルターでろ過する。沈殿をアセトニトリル 5mL で同様の操作を 2 回行う。得られた溶液を合せて、アセトニトリルで正確に 50mL とし試験溶液とした。

##### b)精製

コルヒチン及びデメコルシンが低濃度の場合や、検体が調理されたもので共雑物が多い状態でも検査できるように抽出液の精製法について検討した。

抽出液 2mL に水 8mL 加えて混和、アセトン 4mL、水 4mL でコンディショニングした C18 (1000mg) 固相カラムに注入。アセトニトリル：水 (1 : 9) 2mL で洗浄する。次にメタノール 4mL で溶出させる。溶出液を正確に 4mL とし、試験溶液とした。

#### (5) 添加回収試験

出汁入り大和芋とろろに添加濃度 50mg/kg および 0.01mg/kg となるようにコルヒチンを添加した。

### 3 結果

LC/MS/MS での測定において、検量線についてはメタノールを溶媒とした標準液による絶対検量線法を用いた。検量線は 0.1  $\mu$  g/mL ~ 25  $\mu$  g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。

#### (1) 添加回収試験

試料として出汁入り大和芋とろろを用いてコルヒチンの添加回収試験を実施した。

表 2 コルヒチン 50mg/kg 添加 (5000 倍希釈液を測定)

	測定濃度( $\mu$ g/L)	試料濃度(mg/kg)	回収率
精製なし	10.07	50.35	100.7%
C18 カラム精製	9.78	48.89	97.8%

表 3 コルヒチン 0.01mg/kg 添加 (精製なしは 10 倍希釈液、C18 カラム精製は 20 倍希釈を測定)

	測定濃度( $\mu$ g/L)	試料濃度(mg/kg)	回収率
精製なし	0.696	50.35	69.6%
C18 カラム精製	0.449	48.89	89.8%

結果はコルヒチン 50mg/kg 添加では良好であったが、コルヒチン 0.01mg/kg 添加では精製を行わなかった際の回収率は 69.6%と低下した。

## (2) グロリオサ球根のコルヒチン測定

試料としてグロリオサ球根を用いてコルヒチン及び類縁体のデメコルシンを測定した。この際デメコルシンが低濃度のため共雑物の除去およびマトリックス効果の抑制する目的で C18 カラム精製した試験液を測定した。

表 4 グロリオサ球根中のコルヒチン、デメコルシン濃度

	測定濃度( $\mu$ g/L)	試料濃度(mg/kg)
コルヒチン	5.41	1353.51
デメコルシン	2.34	0.23

※コルヒチンは 25 万倍希釈、デメコルシンは 100 倍希釈を測定

さらに試料に、500・1000・1500mg/kg 相当のコルヒチンを添加し、LC/MS/MS で測定し、標準添加法で濃度計算すると、コルヒチン濃度は 1336.29mg/kg となり絶対検量線法の値とほぼ一致した。

## 4 まとめ

今回、LC/MS/MS による出汁入り大和芋とろろ、グロリオサ球根のコルヒチン測定法を検討したところ、良好な結果が得られた。

本検査法は、誤食による中毒時にコルヒチン・デメコルシンの定性検査が迅速に行え、C18 カラムによる精製で微量なコルヒチン・デメコルシンの定量も行えることが判明し、有用であることが判明した。

今後、イヌサフランのコルヒチン・デメコルシン検査への適用、コルヒチンの類縁体の一つである N-デアセチル-N-ホルミルコルヒチン (グロリオシン) 測定の検討が必要になると考える。

## 参考文献

- 高知衛研報 54,41-45 (2008) グロリオサによる食中毒事例 -LC/MS/MS によるコルヒチンの分析-
- 北海道立衛生研究所報 60,45-48 (2010) 有毒植物イヌサフラン調理品中のコルヒチン残留量
- 山口県環境保健センター所報 52,54-57 (2009) LC/MS/MS による尿中植物性自然毒一斉分析法の検討